

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
Leiter: Prof. Dr. F. Heim

**Der Einfluß von Kaliumcyanid
und einiger Hemmstoffe
des Coenzym A auf Atmung,
Coenzym — A — Aktivität
und den Gehalt von Hefezellen
an anorganischem Phosphat
und einigen organischen Phosphaten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen 1960

Vorgelegt von
Ursula Herzog
aus Breslau

Dekan: Prof. Dr. F. Heim

Referent: Prof. Dr. F. Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 8. 1959

In vorliegender Arbeit wurden Kaliumcyanid und einige Blockersubstanzen von SH-Gruppen — Salyrgan, Oxarsan, Spirotrypan, Neosalvarsan, Janusgrün B, Monojodacetat, Sublimat und Natriumarsenit — hinsichtlich ihrer Wirkung auf Atmung, Coenzym-A-Aktivität, den Gehalt an ATP, ADP und AMP und anP (intracelluläres anorganisches Phosphat) von Hefezellen untersucht. Hauptzweck der Untersuchung war, die Auswirkungen der Blockierung SH-Gruppen haltiger Fermente und den Einfluß der spezifischen Blockierung der Cytochromoxydase auf die Atmung und den Gehalt der Hefezellen an Coenzym A, anP und Adenosinphosphaten kennenzulernen und dadurch einen weiteren Einblick in die Korrelation der Funktionen dieser Stoffwechselfaktoren zu gewinnen.

Über die funktionellen Wechselbeziehungen von Atmung, Coenzym A, anP und Adennucleotiden im normalen Hefezellstoffwechsel liegen unter anderem folgende Befunde vor. LYNEN u. Mitarb. haben an Hefe eine wechselseitige Abhängigkeit von Atemgröße und Coenzym A-Gehalt festgestellt. Sie hat wahrscheinlich dann Gültigkeit, wenn der Glucoseabbau in der Hefe hauptsächlich über den Embden-Meyerhof-Weg und Citronensäurecyclus erfolgt. Denn hierbei ist Coenzym A, und zwar zur Überführung der Abbauprodukte der Glucose in den Citronensäurecyclus unbedingt erforderlich. KREBS, GURIN u. EGGLESTON vermuten auf Grund von Isotopenversuchen mit C14-Acetat, daß nur in der wachsenden Hefezelle der Citronensäurecyclus von Bedeutung sei und hauptsächlich der Bereitstellung von Bausteinen dient. Die Oxydation der Kohlenhydrate in der ruhenden Zelle soll über Kondensationsprodukte, allerdings auch unter Mitbeteiligung des Coenzym A, erfolgen. Auch bei der Benutzung dieses Abbauweges ist noch eine wechselseitige Abhängigkeit von Sauerstoffverbrauch und Coenzym A-Gehalt zu erwarten.

Ein Teil des oxydativen Abbaus der Glucose findet aber in der Hefezelle über die direkte Decarboxylierung im sogenannten Pentosephosphatecyclus statt. Das in den beiden ersten Dehydrierungsstufen des Cyclus reduzierte TPN kann nach



KREBS u. KORNBERG in der gleichen Weise wie reduziertes DPN an der Synthese des ATP teilnehmen. Abhängig vom Typ und Funktionszustand der Hefe können nach BEEVERS u. GIBBS, GIBBS u. BEEVERS sowie BLUMENTHAL u. Mitarb. über den Pentosephosphatcyclus bis zu 50% der Glucose abgebaut werden. Er stellt auch in mehreren Warmblüterorganen einen wichtigen oxydativen Abbauweg für Glucose dar. Bei Inanspruchnahme des Pentosephosphatcyclus benötigt die Hefe zur ATP-Synthese zwar Sauerstoff, nicht dagegen Coenzym A.

Aufbaureaktionen stehen im Vordergrund des Stoffwechsels der Hefezellen, da nach WANG u. Mitarb. von dem der Hefezelle angebotenen Acetat bis zu 88% zu Synthesen verbraucht werden. Zu allen mit Acetylierungen von Hydroxyl- und Amino-Gruppen einhergehenden, zur Synthese von Fetten, Lipoiden, Steroiden, Porphyrinen und Carotinoiden führenden Reaktionen benötigt die Hefezelle das Coenzym A. Seine Bedeutung ist deshalb im anabolen Stoffwechsel nicht geringer als für den oxydativen Abbau der Kohlenhydrate und Fette.

Die wichtigsten Beziehungen zwischen Coenzym A und energiereichen Phosphaten bestehen darin, daß einerseits ATP zum Aufbau des Coenzym A erforderlich ist, auf der anderen Seite das Coenzym A für die Bildung energiereicher Phosphate notwendig ist, zumindest soweit die hierzu erforderliche Energie durch die Endoxydation der Nahrungsstoffe über den Citronensäurecyclus oder den von KREBS angegebenen Weg gewonnen wird.

Nach Beobachtungen von HOLZER sowie WINDISCH u. Mitarb. hängt der Gehalt von Hefezellen an anP zu einem wesentlichen Teil von dessen Penetrationsgeschwindigkeit aus dem umgebenden Milieu in das Zellinnere ab. Die Aufnahme in die Zelle wiederum wird vom Ausmaß der in der Zelle stattfindenden Phosphorylierungsvorgänge wesentlich bestimmt. Da diese in der normalen Hefezelle mit der Atmung weitgehend parallel verlaufen, besteht somit eine quantitative Kopplung von Atmungsgröße, Phosphorylierungsgeschwindigkeit und Phosphataufnahme.

Methodik

Alle Versuche wurden mit Bäckerhefe durchgeführt, die uns von der Hefefabrik Bast, Nürnberg-Buch, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Bei feuchter Lagerung im Kühlschrank konnte sie 2–3 Tage verwendet werden.

Vorbehandlung der Hefe. Zur Aktivierung des Stoffwechsels wurde sie vor Versuchsbeginn 45 min lang bei 30° C in O₂-gesättigter 1%iger Glucoselösung von pH = 7,00 inkubiert.

Ansätze für die Bestimmung von Atmung, Coenzym-A-Aktivität, ADP, ATP, AMP und anP. Sie bestanden aus 1 Teil Hefezellsuspension + 0,6 Teilen m/30 KH₂PO₄-Lösung bzw. in m/30 KH₂PO₄-Lösung gelöster Untersuchungssubstanz und 0,5 Teilen 0,07 molarem Natriumacetat in m/30 KH₂PO₄-Lösung als Atmungssubstrat. Die Hefezellsuspension bestand aus 11,2 g Hefezellen ad 100 ml m/30 KH₂PO₄-Lösung. Die Versuchsdauer betrug 60 min. Während dieser Zeit befanden sich die Ansätze in Luft bei 30° im Schüttelthermostat. Das pH lag bei Versuchsende bei 6,6 ± 0,2.

Die Messung der Atmung erfolgte in der Warburg-Apparatur. Im Hauptteil der Atmungskölbchen befanden sich je 2,6 ml der oben angeführten Ansätze, im

Einsatzgefäß 0,4 ml 8%ige Kalilauge zur Adsorption der Kohlensäure. Ausnahme Salyrgan: hier wurde die KH_2PO_4 -Lösung durch P-Puffer von pH 7,0 ersetzt.

Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung von Coenzym A-SH, ATP, ADP, AMP und anP. Für die Coenzym A-Bestimmung wurden den Versuchsansätzen 10 ml, für die Bestimmung der Nucleotide bzw. des anP 7,5 ml entnommen. Die durch zweimaliges Waschen und Zentrifugieren für die Coenzym A-Bestimmung gewonnenen Hefezellen wurden mit 1,33 ml siedendem Wasser versetzt, im kochenden Wasserbad unter Rühren auf 97° erhitzt, danach sofort im Eisbad abgekühlt, die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, der Überstand zur Analyse verwendet.

Für die Bestimmung der Phosphatverbindungen wurden die gewaschenen Zellen durch Übergießen mit flüssigem Sauerstoff eingefroren, um die Zellwände für Nucleotide durchgängig zu machen. Den noch gefrorenen Zellen wurden zur Bestimmung des anP 2,5 ml 6%ige Perchlorsäure und 2 ml Aqua dest. zugesetzt. Zur Bestimmung der Adenosinphosphate wurden die gefrorenen Hefezellen mit 0,4 ml 6%iger Perchlorsäure versetzt. Die Suspensionen wurden unter fließendem Wasser aufgetaut und zur Extraktion im Eisbad 30 min geschüttelt. Zur Analyse wurden die durch Abzentrifugieren der Zelltrümmer gewonnenen zellfreien Extrakte verwendet.

Bestimmung des Coenzym A. Sie erfolgte nach der von LYNEN modifizierten Methode von KAPLAN u. LIPMANN. Die Methode beruht auf der Bestimmung der von der Coenzym A-Menge abhängigen, mit Hilfe eines Taubenleberfermentes acetylierten Sulfonamidmenge. Der Coenzym A-Gehalt unserer Extrakte wurde an Hand einer Eichkurve bestimmt. Sie wurde mit Hilfe eines Präparates erstellt, das 75% reines Coenzym A-SH enthält. Dieses Präparat hat uns die Fa. C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim, in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung von anP erfolgte nach der von THORN u. Mitarb. abgewandelten Methode von MARTIN u. DOTY. Zur Vermeidung des Zerfalls von labilem Phosphat erfolgte die Bestimmung im Eisbad.

Bestimmung der Adenosinphosphate. Die Extrakte wurden papierchromatographisch nach BURROWS u. Mitarb. vorgereinigt und aufgetrennt, die Nucleotidflecke durch UV-Photographie lokalisiert und ATP, ADP und AMP nach Eluierung mit Hilfe eines optischen Fermenttests bestimmt. Die hierzu benötigten Reagentien (Biochemica Testkombinationen) wurden uns von der Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim-Waldhof, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Die ATP-Bestimmung beruht auf der Reaktion: $3\text{-Phosphoglycerinsäure} + \text{ATP} \rightleftharpoons 1,3\text{-Diphosphoglycerinsäure} + \text{ADP}$. $1,3\text{-Diphosphoglycerinsäure} + \text{DPNH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Glycerinaldehydphosphat} + \text{P} + \text{DPN}^+$.

Durch Abfangen des Glycerinaldehydphosphats mittels Cystein werden die Gleichgewichte ganz auf die Seite des Glycerinaldehydphosphat + P + DPN verschoben, so daß stöchiometrischer Umsatz erfolgt.

Die Bestimmung des ADP beruht auf dem Prinzip: $\text{ADP} + \text{Phosphoenolbrenztraubensäure} \rightarrow \text{ATP} + \text{Brenztraubensäure}$. $\text{Brenztraubensäure} + \text{DPNH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Milchsäure} + \text{DPN}^+$. Der Umsatz erfolgt stöchiometrisch.

Zur Bestimmung von AMP wird nach Stillstand dieser beiden Reaktionen zu dem Fermentansatz der ADP-Bestimmung Myokinasesuspension zugegeben. Dieses Ferment katalysiert die Reaktion $\text{AMP} + \text{ATP} \rightarrow 2\text{ADP}$. Das gebildete ADP läßt die zur ADP-Bestimmung benutzten Reaktionen noch einmal ablaufen und dient als Maß für das vorhandene AMP.

Untersuchte Stoffe. Natriumarsenit Na_3AsO_3 , Sublimat HgCl_2 , Natriumsalz des Monojodacetat $\text{JH}_2\text{C-COONa}$, Kaliumcyanid KCN,

Oxarsan = ein Gemisch aus je 50% 3-Amino-4-oxybenzol-arsen-dichloridchlorhydrat und 3 Amino-4-oxybenzol-arsen-oxyd-chlorhydrat. Spirotrypan = 2-Di($\beta_1\beta$ -dioxypentyl)amino-phenol-(4-Arseno-5-)-benz-oxazolyl-(2)-mercapto-propionsaures Natrium.

Salrygan = (Salicyl-(3-oxymercuri-2-methoxy-propyl)amid-o-essigsaueres Natrium.

Neosalvarsan = Natriumsalz der m-Diamino-p-dioxy-arsenobenzol-methylensulfoxyssäure.

Janusgrün B = eine Azoverbindung aus Diäthylsafranin und Dimethyl-aminoanilin (Mol.-Gew. 511).

Statistik. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Versuchsgruppen und denen der Kontrollen wurden mittels der *t*-Verteilung geprüft. Sie wurden als signifikant angesehen, wenn *P* kleiner als 0,05 war. Jeder Mittelwert stellt das Mittel aus 8—15 Einzelbestimmungen dar.

V Versuchsergebnisse

In der Tabelle werden die zur Erzielung einer 25%igen bzw. 50%igen Hemmung der Coenzym A-Aktivität in den Hefezellen notwendigen millimolaren Konzentrationen der von uns untersuchten Stoffe aufgeführt. Gleichzeitig ergibt sich aus der Tabelle der Einfluß dieser Konzentrationen auf die Atmungsgröße. Hinsichtlich des Verhältnisses der Coenzym A- und atmungshemmenden Wirkung lassen sich 3 Gruppen unterscheiden. Zur ersten gehören Janusgrün B, Neosalvarsan, Salrygan, Oxarsan und Spirotrypan. Selbst Konzentrationen dieser Verbindungen, die zur 50%igen Abnahme der Coenzym A-Aktivität führen, sind noch ohne jeden Einfluß auf die Atmung. Sublimat ist nur in Konzentrationen, die das Coenzym A um 25% senken, ohne signifikanten Einfluß auf die Atmung.

Die Stoffe der zweiten Gruppe, Sublimat in höheren Konzentrationen, Natriumarsenit und Monojodacetat, hemmen in den Konzentrationen, die Coenzym A zu 50% inaktivieren auch die Atmung signifikant.

Die dritte Gruppe stellt Kaliumcyanid dar. Es senkt in allen untersuchten Konzentrationen die Atmung viel stärker als das Coenzym A. Sehr niedrige Konzentrationen hemmen sogar die Atmung ohne die Coenzym A-Aktivität zu beeinflussen.

Die Wirkungen verschiedener Konzentrationen je eines Körpers aus den Gruppen 1, 2 und 3, und zwar des Oxarsan, Sublimat und Kaliumcyanid auf Coenzym A-Aktivität, Sauerstoffaufnahme und den Gehalt an anP, AMP, ADP und ATP ergeben sich aus den Abb. 1, 2 u. 3.

Oxarsankonzentrationen von 10—40 mmol/l (Abb. 1) verändern weder die Sauerstoffaufnahme noch den Gehalt der Hefezellen an anP. Dagegen wird die Coenzym A-Aktivität herabgesetzt. Sie sinkt nahezu

proportional zur Oxarsankonzentration. Der Gehalt der Hefezellen an Adenosinphosphaten nimmt mit steigenden Oxarsankonzentrationen zu. Den stärksten Anstieg zeigt AMP, weniger stark, aber immer noch signifikant nimmt ATP zu. Die ADP-Zunahme dagegen ist nicht mehr signifikant.

Abb. 2 zeigt, daß hinsichtlich der qualitativen Wirkung des Sublimats auf Atmung, anP und Adenosinphosphatgehalt der Hefezellen zwischen geringen (bis 0,2 mmol/l) und höheren Konzentrationen unterschieden werden muß. Bereits aus der Tabelle ging hervor, daß von geringen Sublimatkonzentrationen stärker das Coenzym A, von höheren dagegen

Tabelle

	ED ₂₅	Signif.	Senkung der O ₂ -Aufnahme durch ED ₂₅ in Prozent	Signif.	ED ₅₀	Signif.	Senkung der O ₂ -Aufnahme durch ED ₅₀ in Prozent	Signif.	Hemmstoffe von
Janusgrün B	0,075	S	0	—	0,4	S	0	—	Co A
Neosalvarsan	1,6	S	0	—	6,0	S	0	—	
Oxarsan	7,2	S	0	—	27,5	S	6	—	
Spirotrypan	12,5	S	0	—	30,0	S	1	—	
Salyrgan	22,5	S	0	—	26,5	S	0	—	
Sublimat	0,3	S	10	—					
Sublimat					1,25	S	95	S	Co A
Natriumarsenit	1,1	S	16	S	4,8	S	25	S	und
Monojodacetat	17,0	S	43	S	43,0	S	72	S	Atmg.
Kaliumcyanid	8,0	—	80	S	30,0	S	90	S	Atmg.

ED₂₅ bzw. ED₅₀ = Konzentrationen in mMol/l, die die Coenzym-A-Aktivität um 25⁰/₀ bzw. 50⁰/₀ herabsetzen; S = Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5⁰/₀.

die Atmung stärker gehemmt wird. Auch die Wirkungen geringer Sublimatkonzentrationen auf den Gehalt der Hefezellen an anP und Adenosinphosphaten entsprechen weitgehend denen des Oxarsan. Atmung und anP bleiben unbeeinflußt, das Coenzym A nimmt signifikant ab, die Konzentration an AMP, ADP und ATP nimmt dagegen signifikant zu.

Im Gegensatz dazu führen höhere Sublimatkonzentrationen zur Abnahme des Sauerstoffverbrauchs, des anP, ADP und ATP. Der Anstieg des AMP ist im Gegensatz zur AMP-Zunahme unter geringen Sublimatkonzentrationen sehr wahrscheinlich auf den Zerfall des ATP und ADP in AMP zurückzuführen. In Gegenwart von 0,725 mmol/l Sublimat entspricht der Anstieg des AMP um 0,52 mikromol/g über

den Ausgangswert dem Verlust der Hefezellen an ATP + ADP, der zusammen 0,48 Mikromol/g beträgt.

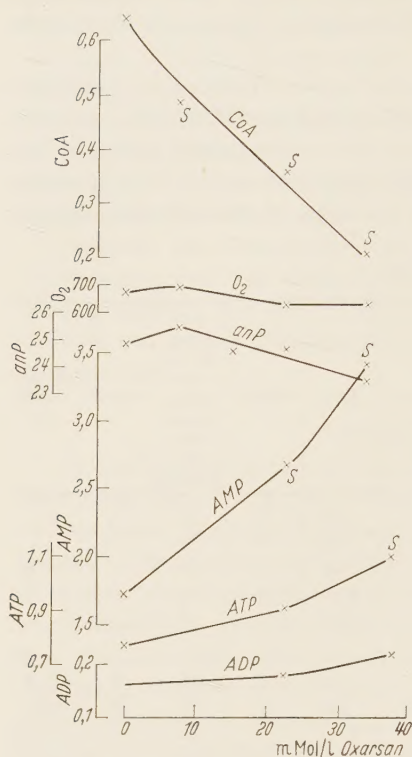


Abb. 1

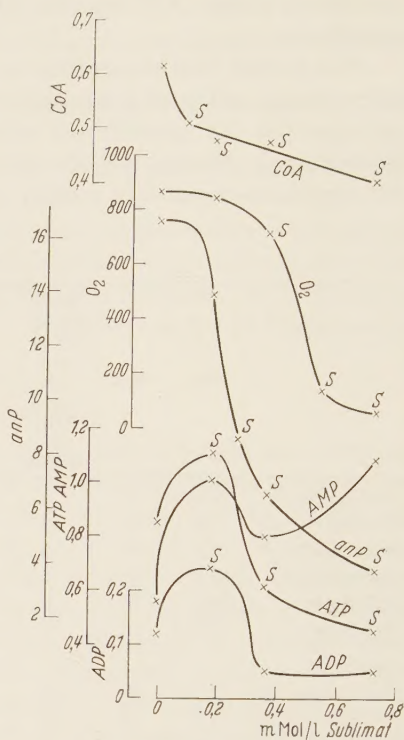


Abb. 2

Abb. 1. Der Einfluß von Oxarsan auf Sauerstoffverbrauch, CoA-Aktivität, anP, AMP, ADP und ATP von Hefezellen. Alle Mengenangaben in $\mu\text{Mol/g}$ Trockengewicht ($\frac{\text{Frischgew.}}{\text{Trockengew.}} = \frac{5}{1}$); S Mittelwert vom Leerwert signifikant verschieden

Abb. 2. Der Einfluß von Sublimat auf Sauerstoffverbrauch, CoA-Aktivität, anP, AMP, ADP und ATP von Hefezellen. Alle Mengenangaben in $\mu\text{Mol/g}$ Trockengewicht ($\frac{\text{Frischgew.}}{\text{Trockengew.}} = \frac{5}{1}$); S Mittelwert vom Leerwert signifikant verschieden

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, entfalten sehr geringe Kaliumcyanidkonzentrationen die gleichen qualitativen Wirkungen auf die Atmung und den Gehalt der Hefezellen an Coenzym A, anP und Adenosinphosphaten, die wir beim Sublimat erst in höheren Konzentrationen beobachtet haben. Durch Kaliumcyanid bereits in einer Konzentration von 15 mmol/l werden Atmung, Coenzym A-Aktivität, anP, ATP und ADP signifikant erniedrigt, während wiederum als Folge des ATP- und ADP-Zerfalls in AMP letzteres zunimmt. Die Bilanz ergibt eine Steigerung

der AMP-Konzentration um 0,34 Mikromol/g über und eine Senkung des ADP + ATP um 0,31 Mikromol/g unter die Ausgangswerte.

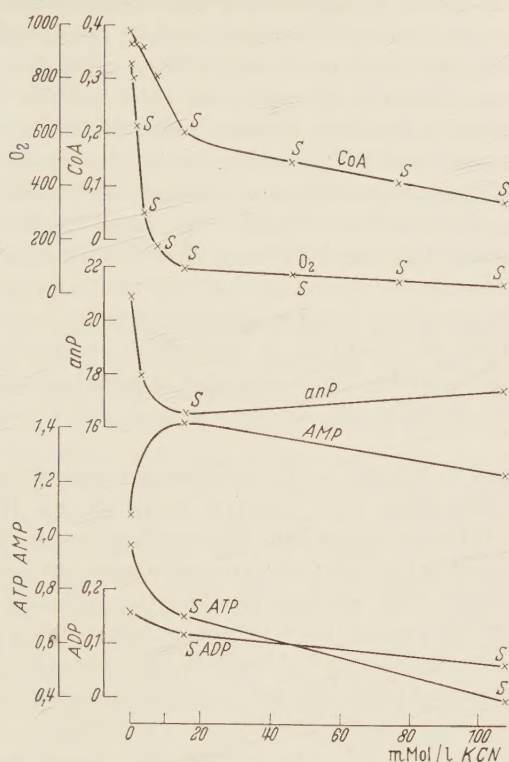


Abb. 3. Der Einfluß von Kaliumcyanid auf Sauerstoffverbrauch, CoA-Aktivität, anP, AMP, ADP und ATP von Hefezellen. Alle Mengenangaben in $\mu\text{Mol/g}$ Trockengewicht $\left(\frac{\text{Frischgew.}}{\text{Trockengew.}} = \frac{5}{1} \right)$; S Mittelwert vom Leerwert signifikant verschieden

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die von uns untersuchten Stoffe, die in den in der Tabelle angeführten Konzentrationen die Coenzym A-Aktivität um 25 bzw. 50% senken, sind mit Ausnahme des KCN, Monojodacetat und Janusgrün anorganische bzw. organische Arsen- und Quecksilberverbindungen. Letztere besitzen die Fähigkeit, durch Mercaptidbildung mit den funktionellen SH-Gruppen von Fermenten deren enzymatische Wirkungen aufzuheben. Über diesen Mechanismus dürfte auch die Blockierung der Thiolwirkgruppe des Coenzym A-SH zustande kommen. Die Inaktivierung des Coenzym A-SH durch Monojodacetat erfolgt über die Bildung eines Thioäthers, der enzymatisch unwirksam ist: $\text{Co-A-SH} + \text{JH}_2\text{C-COOH} \rightarrow \text{CoA-S-CH}_2\text{-COOH} + \text{HJ}$. Doch besteht auch die

Möglichkeit, daß die untersuchten Arsen- und Quecksilberverbindungen und Monojodacetat durch Blockierung thiolgruppenhaltiger, am Aufbau des Coenzym A obligatorisch beteiligter Fermente, die Neubildung des Coenzym A in der Hefezelle hemmen. Der genaue Mechanismus der Hemmung des Coenzym A durch Janusgrün B, der sowohl in einer Inaktivierung der Thiolgruppen, als auch auf der Störung des Coenzym A-Aufbaus in der Zelle beruhen kann, ist unbekannt.

Der Befund, daß trotz 50%iger Hemmung des Coenzym A durch Oxarsan, Spirotrypan, Neosalvarsan, Salyrgan und Janusgrün B die Atmungsgrößen nicht verändert sind, legt zwei Erklärungsmöglichkeiten nahe. Entweder reicht bereits ein Teil des Gesamt-Coenzym A der normalen Hefezelle zur Aufrechterhaltung der Atmung aus, so daß der Rest ohne Störung der Atmung blockiert werden kann. Oder aber bei der Blockierung des Coenzym A verläuft in steigendem Maße der Abbau der energieliefernden Substrate über Oxydationswege, an denen Coenzym A nicht beteiligt ist. Hierfür kommt der Pentosephosphatcyclus in Frage.

Die von LYNEN u. Mitarb. an Hefezellsuspensionen festgestellte Abhängigkeit der Atemgröße vom Coenzym A-Gehalt der Hefezellen erfährt, wie unsere Versuche zeigen, eine Entkopplung durch Stoffe, die das Coenzym A inaktivieren bzw. die Cytochromoxydase spezifisch blockieren. Im ersten Falle bleibt trotz starker Abnahme der Coenzym A-Aktivität die Atmung intakt, im zweiten Falle kommt es trotz starker Senkung der Atmung nicht zur signifikanten Abnahme der Coenzym A-Aktivität, denn eine Senkung der Atmung bis auf $\frac{1}{5}$ des Ausgangswertes bleibt, wie Abb. 3 zeigt, ohne signifikante Abnahme des Coenzym A. Eine weitere Senkung der Atmung auf 10% und weniger des Ausgangswertes durch höhere Cyanidkonzentrationen führt schließlich auch zur signifikanten Senkung des Coenzym A. Vermutlich fehlen dann der Hefezelle bestimmte, nur im Oxydationsstoffwechsel, z. B. im Citronensäure- oder Pentosephosphatcyclus gebildete, zum Aufbau des Coenzym A benötigte Bauelemente, unter anderem vielleicht auch das ATP. Denn zum Aufbau eines Mol Coenzym A-SH werden 4 Mol ATP benötigt.

Durch Konzentrationen von Monojodacetat, Natriumarsenit und Sublimat, die die Coenzym A-Aktivität um 50% vermindern, wird auch die Atmung signifikant gesenkt. Die Hemmwirkung dieser Konzentrationen erstreckt sich scheinbar außer auf Coenzym A auch auf andere thiolgruppenhaltige, an der Atmung beteiligte Enzyme. Zu ihnen gehören unter anderem Hexokinase, Brenztraubensäuredecarboxylase, Triosephosphat-, Isocitronensäure-, α -Ketoglutar säure- und Bernsteinsäure-Dehydrogenase.

Auf Grund der in Abb. 1—3 wiedergegebenen Versuchsergebnisse scheinen zwischen Atmung, Coenzym A-Aktivität und dem Gehalt der

Hefezellen an anP- und Adenosinphosphaten folgende Beziehungen zu bestehen: Solange nur der Coenzym A-Gehalt, nicht dagegen die Atmung erniedrigt ist, — das ist in den mit Oxarsan in 10—40 millimolaren und mit Sublimat in 0,1—0,2 millimolaren Konzentrationen durchgeführten Versuchen der Fall — bleibt der Gehalt der Hefezellen an anP unverändert und AMP, ADP und ATP nehmen zu. Kommt es dagegen zur signifikanten Abnahme des Coenzym A und des Sauerstoffverbrauchs — das ist in den mit KCN und höheren Sublimatkonzentrationen durchgeführten Versuchen der Fall, — so nehmen anP, ATP und ADP in den Hefezellen ab, während die AMP-Konzentration um etwa die gleiche Menge ansteigt, um die sich der ATP- und ADP-Gehalt der Hefezellen vermindert.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, verläuft die Aufnahme von anP in die Hefezellen der Atmung und den Phosphorylierungsvorgängen in der Zelle weitgehend parallel. Diese Beobachtungen von HOLZER sowie WINDISCH u. Mitarb. werden durch unsere Versuche, in denen die Abnahme des intracellulären anP stets mit einer Senkung der Sauerstoffaufnahme und der Phosphorylierung (Abfall des ATP und ADP zu Gunsten des AMP) verbunden ist, bestätigt. Der Abfall des ATP und ADP und die Zunahme des AMP lassen sich, da sie gleichzeitig mit einer Schädigung der Atmung und Phosphataufnahme einhergehen, unschwer als die Folge eines aus der Störung der oxydativen Phosphorylierung sich ergebenden Substrat- und Energiemangels erklären. Es besteht kein Grund zur Annahme, daß die Abnahme der Atmung mit dem Coenzym A-Mangel der Zelle im ursächlichen Zusammenhang steht, da nach den Ergebnissen der Versuche mit Oxarsan, Spirotrypan, Neosalvarsan und Salyrgan selbst eine starke Senkung der Coenzym A-Aktivität noch keine Änderung der Atmung zur Folge haben muß.

Aus den mit Oxarsan (Abb. 1) und niedrigen Sublimatkonzentrationen (Abb. 2) durchgeführten Versuchen ergibt sich, daß bei intakter Atmung und unvermindertem intracellulärem anP eine signifikante Abnahme der Coenzym A-Aktivität zur Zunahme des ATP, ADP und AMP in den Hefezellen führt. Für die Erklärung dieser Befunde ist von Bedeutung, daß für zahlreiche energieverbrauchende Aufbaureaktionen Coenzym A in der Zelle als Biokatalysator notwendig ist. Man darf annehmen, daß deshalb der Mangel an aktivem Coenzym A das Ausmaß der in der Zelle ablaufenden energieverbrauchenden Synthesen so eingeschränkt, daß sich als Folge eines Energieüberschusses ATP und ADP in der Zelle anreichern. Damit ist die Zunahme des AMP noch nicht geklärt. Aber auch dessen Konzentrationssteigerung kann als mittelbare Folge einer durch Coenzym A-Mangel bedingten Störung des anabolen Hefezellstoffwechsels gedeutet werden. AMP bildet nicht nur die Ausgangssubstanz

für ATP und ADP, es ist außerdem ein wichtiger Grundbaustein der Polynucleotide und Nucleoproteide. Bei der engen Verknüpfung aller Stoffwechselvorgänge miteinander ist denkbar, daß die auf Wachstum und Vermehrung eingestellten Hefezellen die Polynucleotidsynthesen einschränken, wenn andere Zellbausteine, deren Synthese an die Anwesenheit von Coenzym A geknüpft ist, nicht mehr in ausreichender Menge gebildet werden können.

Ein weiterer Grund für die Anreicherung des Adenosinmono-, di- und -triphosphats ist wahrscheinlich außer in dem herabgesetzten Verbrauch, in der nicht reduzierten Synthese dieser Verbindungen zu suchen, denn der Sauerstoffverbrauch und damit wahrscheinlich auch die Bildung von Oxydationsenergie sind in Gegenwart der Oxarsan- und Sublimatkonzentrationen, die den Gehalt der drei Adenosinphosphate erhöhen, nicht vermindert.

Zusammenfassung

Hemmstoffe des Coenzym A, und zwar die anorganischen und organischen Arsen- und Quecksilberverbindungen, Natriumarsenit, Sublimat, Oxarsan, Spirotrypan, Neosalvarsan und Salyrgan sowie Janusgrün B und Monojodacetat und der spezifische Blocker der Cytochromoxydase Kaliumcyanid wurden an Hefezellsuspensionen hinsichtlich ihrer Wirkung auf Atmung, Coenzym A-Aktivität, AMP, ADP und ATP und intracelluläres anP untersucht.

Die meisten Stoffe führen innerhalb bestimmter Konzentrationsbereiche zur Entkopplung der von LYNEN u. Mitarb. beschriebenen Beziehung zwischen Atmung und Coenzym A-Gehalt der Hefezellen. Denn der Coenzym A-Verlust geht nicht obligatorisch mit einer Senkung der Atmung, die Hemmung der Atmung durch geringe Cyanidkonzentrationen nicht mit einer solchen des Coenzym A einher.

Die Abnahme des Coenzym A — sei sie die Folge der Blockierung der funktionellen SH-Gruppen des Coenzym A oder einer Störung der Coenzym A-Synthese — führt, solange die Sauerstoffaufnahme und der stationäre Gehalt an anP keine Änderungen erfahren, zur Erhöhung der ADP, AMP und ATP-Konzentrationen in den Hefezellen. Die Ursache der ATP- und ADP-Zunahme liegt vermutlich unmittelbar im Coenzym A-Mangel, der die Hefezellen zur Einschränkung zahlreicher, vom Coenzym A abhängiger, energieverbrauchender Synthesen zwingt, die Zunahme der Adenylsäure in einer vom Coenzym A-Mangel mittelbar induzierten Hemmung der Polynucleotidsynthesen. Kaliumcyanid und Sublimat in höheren Konzentrationen schädigen die Atmung und setzen dadurch den Gehalt der Hefezellen an Coenzym A, anP, ATP und ADP herab, während AMP eine der ATP- und ADP-Abnahme entsprechende Zunahme erfährt.

Literatur

- BEEVERS, H., and M. GIBBS: *Nature* (Lond.) **173**, 640 (1954).
BLUMENTHAL, H. J., K. F. LEWIS and S. WEINHOUSE: *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 6093 (1954).
BURROWS, S., F. S. M. GRYLLS and J. S. HARRISON: *Nature* (Lond.) **170**, 800 (1952).
GIBBS, M., and H. BEEVERS: *Plant Physiol.* **30**, 343 (1955).
HOLZER, H.: *Biochem. Z.* **324**, 144 (1953).
KAPLAN, N. O., and F. LIPMANN: *J. biol. Chem.* **174**, 37 (1948).
KREBS, H. A., S. GURIN and L. V. EGGLESTON: *Biochem. J.* **51** 614 (1952).
KREBS, H. A., and H. L. KORNBERG: *Ergebn. Physiol.* **49**, 212 (1957).
LYNEN, F., E. REICHERT u. L. RUEFF: *Liebigs Ann.* **574**, 1 (1951).
MARTIN, J. B., and M. DOTY: *Analyt. Chem.* **21**, 965 (1949).
THORN, W., G. PFLEIDERER, R. A. FROWEIN u. I. ROSS: *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **261**, 334 (1955).
WANG, C. H., C. T. GREGG, I. A. FORBUSCH, B. E. CHRISTENSEN and V. H. CHELDELIN: *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1869 (1956).
WINDISCH, F., W. HEUMANN u. W. NORDHEIM: *Naturwissenschaften* **42**, 649 (1955).
WINDISCH, F., W. NORDHEIM u. W. HEUMANN: *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **303**, 153 (1956).

LEBENS LAUF

Am 30. Januar 1935 wurde ich in Breslau geboren, wo mein Vater Rechtsanwalt und Notar war. Nach der Flucht 1945 kam ich mit meinen Eltern nach Bayern. Hier besuchte ich das Realgymnasium zuerst in Zangberg/Obb. und anschließend in Regensburg, wo ich 1953 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1953 fing ich an in Erlangen Medizin zu studieren. Im Juli 1959 habe ich das medizinische Staatsexamen mit gut bestanden. Ich habe die ganze Zeit über nur in Erlangen studiert. Mein Vater ist in Nürnberg Landgerichtsrat.

